



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 292 265**

⑫ Número de solicitud: 200300733

⑮ Int. Cl.:
A23D 9/00 (2006.01)
C11B 1/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
A01H 4/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE ADICIÓN A LA PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.03.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.03.2008

⑯ Número de solicitud de la patente principal:
9902552

⑰ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Haro Bailón, Antonio de;
Río Celestino, Mercedes del;
Fernández-Martínez, José M. y
Velasco Varó, Leonardo**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Mejoras introducidas en la patente principal nº 9902552: "Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico".**

㉑ Resumen:
Mejoras introducidas en la patente principal nº 9902552: "Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico".
La presente invención se refiere a un aceite de semilla de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) carente de ácido erúico (menos de 0.5% en peso respecto al contenido total en ácidos grasos del aceite) y con un contenido en ácido oleico entre el 80% y el 90% en peso del total de ácidos grasos. Este tipo de aceite no es producido en la naturaleza por plantas de mostaza etíope y ha sido obtenido mediante un procedimiento biotecnológico. El aceite de mostaza etíope, objeto de la presente invención, se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo, y la carencia de ácido erúico y el alto contenido en ácido oleico de este aceite constituyen características heredables.

ES 2 292 265 A1

DESCRIPCIÓN

Mejoras introducidas en la patente principal nº 9902552: "Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico".

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca en el sector de la agricultura, debido a que se trata de un nuevo tipo de aceite producido por semillas de plantas mejoradas genéticamente. Este nuevo tipo de aceite tiene una amplia gama de aplicaciones, tanto en el sector alimentario, donde aporta claras ventajas nutricionales y tecnológicas, como en el sector industrial, principalmente como biocombustible y biolubrificante.

Estado de la técnica

La mostaza etíope es una especie vegetal autóctona de Etiopía, donde se cultiva a pequeña escala como verdura y como planta oleaginosa, debido a que sus semillas contienen alto contenido en aceite. Este aceite posee un bajo contenido en ácido oleico, entre el 8% y el 13%, y un alto porcentaje de ácido erúcico, entre el 38% y el 45% (A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A. Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987). A finales de los años 50 se planteó la posible existencia de efectos perjudiciales derivados del empleo de aceites ricos en ácido erúcico en alimentación humana, planteamiento que se acentuó a raíz de una serie de estudios realizados durante los años 70, y que pusieron de manifiesto que los ácidos grasos C22:1 resultaban cardiotoxicos en animales, y por tanto, potencialmente tóxicos para el hombre. Por este motivo, aceites con alto contenido en ácido erúcico no deben destinarse a consumo humano. (FAO/OMS, "Las grasas y aceites en la nutrición humana", Estudio FAO: Alimentación y Nutrición, nº 3, FAO, Roma, 1977).

Trabajos realizados en diferentes partes del mundo han demostrado las ventajas de la mostaza etíope frente a otras especies como la colza (*Brassica napus*) y la mostaza india (*Brassica juncea*), cuando se cultivan en regiones semiáridas, debido a su mayor resistencia a la sequía (E. Fereres, J. M. Fernández Martínez, I. Mínguez y J. Domínguez: Productivity of *Brassica juncea* and *Brassica carinata* in relation to rapeseed, *B. napus*. I. Agronomic Studies. En: Proc. 6th Int. Rapeseed Conf., Paris, Francia 1983, pág. 293-298). Otra de las ventajas de la mostaza etíope respecto a otras Brassicas oleaginosas es su mayor resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades (I.J. Anand, J.P. Sing y R. S. Malik: *B. carinata* a potential oilseed crop for rainfed agriculture. *Eucarpia Cruciferae* Newsletter 10: 76-78. 1985; R.K. Gugel, g. Seguin-Swartz y A. Petrie: Pathogenicity of three isolates of *Leptosphaeria maculans* on Brassica species and other crucifers. Can. J. Plant Pathol. 12: 75-82. 1990).

Se han desarrollado hasta la fecha dos tipos de semillas de mostaza etíope que producen aceite con bajo contenido en ácido erúcico, potencialmente utilizables en alimentación humana. El primer tipo se obtuvo a través de un programa de cruzamientos entre diferentes plantas de mostaza etíope con niveles intermedios de este ácido graso (L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991). El segundo tipo se obtuvo mediante cruzamientos interespecíficos entre plantas de mostaza etíope con alto contenido en ácido erúcico y plantas de mostaza india (*Brassica juncea* [L.] Czern.) carentes de ácido erúcico (A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994). La composición en ácidos grasos de ambos tipos de semillas, así como del tipo normal, se presenta en la Tabla 1. El contenido en ácido oleico de ambos tipos de semillas de mostaza etíope carentes de ácido erúcico fue inferior al 40%.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Ácidos grasos en aceite de mostaza etíope

Variedad	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúxico
Normal ¹	3.7	1.0	8.9	20.5	14.7	8.1	39.0
Cero erúxico ²	5.8	1.2	39.0	29.5	22.2	1.1	0.2
Cero erúxico ³	6.0	1.7	28.3	38.1	22.9	1.1	0.1

(1) A. Getinet "Review on breeding of Ethiopian mustard, *Brassica carinata* A.Braun", Proceedings 7th International Rapeseed Conference, pag. 593-597, 1987

(2) L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991.

(3) A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994.

En la actualidad se buscan aceites vegetales que posean un elevado contenido en ácido oleico, tanto para su empleo en alimentación humana como para su uso industrial. En alimentación humana, un aceite con alto contenido en ácido oleico presenta varias ventajas. En primer lugar, este tipo de aceite es muy estable frente a la oxidación. Durante la misma, se producen sustancias que confieren sabor y olor desagradables, lo que reduce considerablemente la vida media del aceite en el mercado. Asimismo, algunas de las sustancias producidas como consecuencia de la oxidación del aceite están relacionadas con la formación de peróxidos, causantes de la formación de radicales libres que a su vez se han relacionado con procesos cancerígenos (Vles y Gottembos "Nutritional characteristics and food uses of vegetable oils" Oil Crops of the World, McGraw-Hill, EE.UU, pag. 63-86, 1989). En segundo lugar, estudios clínicos han demostrado que aceites ricos en ácido oleico reducen los niveles de colesterol total y de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre (Mattson y Grundy "Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man" J. Lipid Res. 26:194-202, 1985). En tercer lugar, el aceite rico en ácido oleico es altamente termoestable, por lo que su uso en frituras es aconsejable (M.C. Dobarganes y col. "Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils" J. Agr. Food. Chem. 41:678-681, 1993). En el campo industrial, los aceites con alto contenido en ácido oleico son muy demandados, especialmente por parte de la industria de aceites lubricantes, precisamente por su alta termoestabilidad (S. Harold y col. "Varieties of rapeseed oil and derived products for use in fuels and lubricants" Proceedings 9th International Rapeseed Conference, pag. 1341-1344, 1995).

Se han desarrollado variedades de colza (*Brassica napus* L.) (US-5955623; US-5625130; US-5840946; US-5638637) y napina (*Brassica rapa* L.= *Brassica campestris* L.) (US-5638637; US-5840946) con una composición modificada de ácidos grasos, que contienen al menos un 80% en peso de ácido oleico y menos de un 0.1% en peso de ácido erúxico, siempre referido al contenido total de ácidos grasos. La invención aplicada al material vegetal desarrollado en US-5625130 ha sido dirigida a la obtención de plantas de *Brassica napus* (genoma AACC 2n=38), *Brassica campestris* (genoma AA 2n=20) o *Brassica juncea* (genoma AABB, 2n= 38), no habiéndose descrito hasta la fecha el procedimiento de obtención de plantas de *Brassica carinata* (genoma BBCC, 2n=34) cuyas semillas produzcan un aceite con las características de bajo contenido en ácido erúxico y alto contenido en ácido oleico que muestran las plantas objeto de la presente invención. Las diferencias genómicas entre *Brassica carinata* y el resto de las Brassicas oleaginosas impide la transferencia genética entre ellas, y por lo tanto las plantas de *Brassica carinata* objeto de la presente invención pueden ser cultivadas en la proximidad de otras especies de Brassicas oleaginosas sin peligro de contaminación y descenso del alto contenido oleico ni de modificación del patrón de los restantes ácidos grasos de la semilla.

Explicación de la invención

Uno de los objetos de la invención es un aceite vegetal obtenido de semillas de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) modificadas biotecnológicamente. Este aceite carece de ácido erúxico (menos del 0.5%

en peso), lo que le permite ser usado en alimentación humana. Asimismo, este aceite vegetal presenta un alto contenido en ácido oleico, comprendido entre el 80% y el 90% en peso del total de ácidos grasos. Los restantes ácidos grasos presentes en el aceite de mostaza etíope objeto de la presente invención están comprendidos entre el 2% y el 8% en peso de ácido palmítico; entre el 0.5% y el 3% en peso de ácido esteárico; entre el 2% y el 6% en peso de ácido linoleico; entre el 2% y el 10% en peso de ácido linolénico; e inferior al 4% en peso de ácido eicosenoico. El contenido de otros ácidos grasos menores (mirístico, palmitoleico, behénico, nervónico) es siempre inferior al 2% en peso. El ratio de ácido oleico: ácido linoleico es siempre superior a 15, siendo habitual contenidos de ácido oleico superiores al 85% en peso. El contenido en ácido erúico puede ser inferior al 0.1% e incluso inferior al 0.05% en peso.

Este aceite de semilla de mostaza etíope puede ser utilizado en alimentación humana y animal. También puede ser utilizado como biolubricante y biocombustible.

Asimismo, constituyen otro objeto de la presente invención las semillas, las plantas modificadas genéticamente que dan lugar al aceite libre de ácido erúico y con alto contenido en ácido oleico, mencionado en los párrafos anteriores, y el procedimiento de obtención de dichas plantas. Dicho procedimiento de obtención de las plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun), comprende las siguientes etapas:

- a) Tratamiento de semillas normales de mostaza etíope, previamente embebidas en agua durante 16 horas, con una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración comprendida entre el 0.1% y el 2% (vol/vol), durante un periodo de tiempo comprendido entre 0.5 y 6 horas.
- b) Cultivo de las semillas tratadas según el apartado a), selección de aquellas que presentan un incremento en el contenido en ácido oleico del aceite en comparación con las semillas de plantas normales, manteniendo un contenido en ácido erúico similar al de aquellas.
- c) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido erúico del aceite con plantas de una línea colza (*B. napus* L.) con menos del 2% en peso de ácido erúico en el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y selección de plantas de mostaza etíope con menos del 2% en peso de ácido erúico en el aceite de sus semillas.
- d) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido erúico del aceite con plantas de una línea de mostaza india (*B. juncea* [L.] Czern.) con menos del 2% en peso de ácido erúico en el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y selección de plantas de mostaza etíope con menos del 2% en peso de ácido erúico en el aceite de sus semillas.
- e) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope obtenidas según el apartado c) con plantas de mostaza etíope obtenidas según el apartado d), seguido de autofecundación y selección de plantas de mostaza etíope procedentes del mencionado cruzamiento con menos del 2% en peso de ácido erúico en el aceite de sus semillas.
- f) Recombinación genética entre plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de mutagénesis química [etapas a) y b)] y plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de cruzamientos interespecíficos [etapas c), d) y e)], seguida de autofecundación y selección de semillas con bajo contenido en ácido erúico y alto contenido en ácido oleico.
- g) Siembra de las semillas seleccionadas en la etapa f), seguida de autofecundación y selección para obtener una línea estable de mostaza etíope con bajo contenido en ácido erúico y alto contenido en ácido oleico.
- h) Recombinación genética entre plantas de mostaza etíope obtenidas en las etapas a) a g) y plantas de mostaza etíope caracterizadas por contenido estándar en ácido oleico y bajo contenido en ácido linolénico, seguida de autofecundación y selección de semillas F₂ que presentan mayor contenido en ácido oleico y menor contenido en ácido linoleico y ácido linolénico que las procedentes de las plantas desarrolladas en las etapas a) a g).

Descripción detallada de la invención

Para la obtención de las plantas modificadas genéticamente cuyas semillas producen el aceite objeto de la presente invención se ha llevado a cabo un largo proceso de mejora genética consistente en (1) programa de mutagénesis química, (2) programa de cruzamientos interespecíficos, (3) programa de recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de mutagénesis química y productos obtenidos en el programa de cruzamientos interespecíficos, y (4) programa de cruzamientos intraespecíficos dirigido a realizar una mejora adicional del material desarrollado.

El programa de mutagénesis química consistió en el tratamiento de semillas normales con un producto químico con propiedades mutagénicas, esto es, capaz de inducir mutaciones en el ADN de la planta. Para que estas mutaciones resulten útiles, deben ser heredables, por lo que al tratamiento mutagénico siguió un proceso de varios años consistente en la identificación y fijación de aquellas mutaciones heredables que eran transmitidas de generación en generación.

Como resultado de este programa se obtuvieron plantas de mostaza etíope cuyas semillas presentaban un incremento en el contenido en ácido oleico respecto a las semillas de plantas normales, aunque mantenían un contenido en ácido erúxico similar al de semillas de plantas normales. El programa de mutagénesis se llevó a cabo durante cinco generaciones, al cabo de las cuales se demostró la estabilidad genética del carácter alto oleico en fondo alto erúxico, independiente de las condiciones de cultivo de las plantas.

El programa de cruzamientos interespecíficos consistió en la transferencia de los genes responsables de la ausencia de ácido erúxico desde material público de colza (nombre científico *Brassica napus* L.) y de mostaza india (nombre científico *Brassica juncea* [L.] Czern.) libres de ácido erúxico (menos del 2% en peso de ácido erúxico) a una línea seleccionada de mostaza etíope. El programa de cruzamientos interespecíficos se llevó a cabo mediante tres subprogramas: (a) cruzamiento interespecífico entre material de colza libre de ácido erúxico y una línea seleccionada de mostaza etíope, seguido de una generación de retrocruzamiento hacia el parental de mostaza etíope y tres generaciones adicionales de autofecundación; (b) cruzamiento interespecífico entre material de mostaza india libre de ácido erúxico y una línea seleccionada de mostaza etíope, seguido de una generación de retrocruzamiento hacia el parental de mostaza etíope y tres generaciones adicionales de autofecundación; (c) recombinación genética entre plantas de mostaza etíope procedentes de cruzamientos interespecíficos con material de colza libre de ácido erúxico y plantas de mostaza etíope procedentes de cruzamientos interespecíficos con material de mostaza india libre de ácido erúxico. Dicha recombinación genética se llevó a cabo durante seis generaciones, al cabo de las cuales se demostró la estabilidad del carácter cero erúxico, independiente de las condiciones de cultivo de las plantas.

El programa recombinación genética entre productos obtenidos en el programa de mutagénesis química y productos obtenidos en el programa de cruzamientos interespecíficos se llevó a cabo durante cuatro generaciones, tras las que se demostró la estabilidad de los caracteres cero erúxico y alto oleico, independientes de las condiciones de cultivo de las plantas.

En último término, se llevó a cabo un programa de cruzamientos intraespecíficos dirigido a conseguir un incremento adicional del contenido en ácido oleico de las semillas mediante la introducción de genes que provocan un bloqueo parcial de la desaturación de ácido linoleico a ácido linolénico. Al encontrarse previamente bloqueada parcialmente la desaturación de ácido oleico a ácido linoleico, la introducción de los nuevos genes se tradujo en una reducción de los contenidos en ácido linoleico y ácido linolénico y un incremento del contenido en ácido oleico en el aceite de las semillas. Este incremento adicional del contenido en ácido oleico se expresa de forma estable independientemente de las condiciones de cultivo de las plantas.

Modo de realización de la invención

Primero

Programa de mutagénesis química

Semillas de mostaza etíope de la línea C-101, con 8.5% de ácido oleico, fueron sumergidas en agua a temperatura ambiente durante 16 horas para promover el ablandamiento de la cubierta externa y, por tanto, favorecer la penetración del agente mutagénico. Pasado este tiempo, se sumergieron por un período de 2 horas a temperatura ambiente y con una agitación continua a 75 r.p.m. en una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración del 1% (vol/vol) en tampón fosfato 0.1 M a pH 7. Tras el tratamiento mutagénico las semillas se lavaron durante 10 horas en agua corriente, se secaron, y se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente, y las semillas de cada una de las plantas cosechadas se sembraron en campo. Las plantas correspondientes se cosecharon individualmente y sus semillas se analizaron para conocer su composición en ácidos grasos. A partir de estos análisis, se seleccionó una planta con un contenido anormalmente alto en ácido oleico (19.3%). En sucesivas generaciones se realizó selección para aumentar y estabilizar su contenido en ácido oleico. Finalmente, se obtuvo una línea en la quinta generación con valores máximos y mínimos de 27.9% y 17.0%, respectivamente, de ácido oleico. La línea se denominó N2-3591. Su composición media en ácidos grasos, comparada con la línea a partir de la que se obtuvo, C-101, se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

Ácidos grasos en %

Variedad	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúxico
C-101	3.7	1.1	8.5	20.6	11.6	7.4	43.5
N2-3591	3.2	1.0	23.3	8.3	6.6	9.6	47.2

Segundo

Programa de cruzamientos interespecíficos

Las plantas de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración BBCC. Las plantas de mostaza india (nombre científico *Brassica juncea* [L.] Czern) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración AABB. Las plantas de colza (nombre científico *Brassica napus* L.) tienen un genoma en el núcleo de sus células que es de configuración AACC. Para conseguir plantas de genoma BBCC con el aceite de sus semillas carente de ácido erúxico, se realizó un programa de cruzamientos interespecíficos entre una planta de material público de colza cero erúxico, con menos del 2% en peso de ácido erúxico (*B. napus* L. cv. "Duplo"), una planta de material público de mostaza india cero erúxico, con menos del 2% en peso de ácido erúxico (*B. juncea* cv. "Zem-1"), y una planta de mostaza etíope con niveles normales de ácido erúxico, entre 39% y 49% en peso de ácido erúxico (*B. carinata* cv. "C-101"). Este programa se realizó mediante tres subprogramas:

2.1. Subprograma de cruzamientos entre C-101 y Duplo

Una planta de mostaza etíope C-101 se cruzó con una planta de colza Duplo. Las semillas obtenidas de este cruzamiento se sembraron en macetas y varias de las plantas resultantes se cruzaron de nuevo con plantas de C-101. Las plantas de las semillas resultantes del cruzamiento se autofecundaron durante tres generaciones, tras lo cual se obtuvieron plantas de configuración genómica ABCC, con los genes para cero erúxico procedentes de colza incorporados.

2.2. Subprograma de cruzamientos entre C-101 y Zem-1

Una planta de mostaza etíope C-101 se cruzó con una planta de mostaza india Zem-1. Las semillas obtenidas de este cruzamiento se sembraron en macetas y varias de las plantas resultantes se cruzaron de nuevo con plantas de C-101. Las plantas de las semillas resultantes del cruzamiento se autofecundaron durante tres generaciones, tras lo cual se obtuvieron plantas de configuración genómica BBAC, con los genes para cero erúxico procedentes de mostaza india incorporados.

2.3. Subprograma de cruzamientos entre plantas de configuración genómica ABCC y BBAC

Plantas de configuración genómica ABCC y BBAC se cruzaron entre sí. Las semillas procedentes de los cruzamientos se sembraron. Las plantas a las que dieron lugar se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Sus semillas fueron analizadas para conocer la composición en ácidos grasos de su aceite. De un total de 507 plantas analizadas, 45 de ellas presentaron un bajo contenido en ácido erúxico (menos del 2% en peso de este ácido graso). Las semillas de cinco de estas plantas fueron sembradas, tras lo que se realizó un proceso de selección durante tres generaciones. La mejor de estas cinco líneas se denominó 25X-1. Su composición en ácidos grasos, en comparación con sus parentales C-101, Duplo, y Zem-1 se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

Ácidos grasos en %

Variedad	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúxico
25X-1	5.0	1.3	38.6	42.9	10.2	1.2	0.2
C-101	3.7	1.1	8.5	20.6	11.6	7.4	43.5
Duplo	4.1	1.5	45.3	37.2	8.7	1.7	0.2
Zem-1	4.1	1.2	45.4	36.8	9.5	1.9	0.3

Tercero

Programa de cruzamientos entre N2-3591 y 25X-1

Plantas del mutante alto oleico en fondo alto erúxico, N2-3591, se cruzaron con plantas de la línea cero erúxico 25X-1. Las semillas obtenidas del cruzamiento se sembraron en macetas y las correspondientes plantas se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Las semillas procedentes de estas plantas se analizaron para la composición en ácidos grasos de su aceite. De un total de 300 semillas analizadas se identificaron cinco que combinaban el ca-

rácter cero erúcico con el carácter alto oleico. Estas semillas se sembraron y autofecundaron, procediéndose a una selección durante dos generaciones para alto contenido en ácido oleico y bajo contenido en ácido erúcico. Al cabo de esta selección se obtuvo la línea IAS-3, que contiene menos del 2% en peso de ácido erúcico y entre el 70% y 80% en peso de ácido oleico. La composición en ácidos grasos de IAS-3, comparada con las líneas a partir de las que se obtuvo y con otras líneas de mostaza etíope cero erúcico desarrolladas hasta la fecha, se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Ácidos grasos en %

Variedad	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúcico
IAS-3	3.6	1.6	74.4	10.6	7.7	1.5	0.2
25X-1	5.0	1.3	38.6	42.9	10.2	1.2	0.2
N2-3591	3.2	1.0	23.3	8.3	6.6	9.6	47.2
Cero erúcico ¹	5.8	1.2	39.0	29.5	22.2	1.1	0.2
Cero erúcico ²	6.0	1.7	28.3	38.1	22.9	1.1	0.1

(1) L.C. Alonso y col. "The outset of a new oilseed crop: *Brassica carinata* with low erucic acid content", Proceedings 8th International Rapeseed Conference, pag. 170-176, 1991

(2) A. Getinet y col. "Development of zero erucic acid Ethiopian mustard through interspecific cross with zero erucic acid Oriental mustard", Can. J. Plant Sci. 74:793-795, 1994

Cuarto

Programa de cruzamientos entre IAS-3 y IAS-21

Plantas de la línea IAS-3 (número de solicitud de patente 9902552) se cruzaron con plantas de la línea IAS-21 (número de solicitud de patente 9902553), caracterizadas por un contenido estándar en ácido oleico y un bajo contenido en ácido linolénico en el aceite de sus semillas. Las semillas obtenidas del cruzamiento se sembraron en macetas y las correspondientes plantas se autofecundaron y se cosecharon individualmente. Las semillas procedentes de estas plantas se analizaron para la composición en ácidos grasos de su aceite. De un total de 1250 semillas analizadas, se identificaron seis semillas que presentaron un incremento adicional del contenido en ácido oleico junto con una reducción de los contenidos en ácido linoleico y ácido linolénico. Estas semillas recombinantes se sembraron, llevándose a cabo un proceso de selección durante tres generaciones para asegurar la fijación del nuevo perfil de ácidos grasos. Este perfil se demostró completamente fijado y estable a partir de la segunda generación, expresándose con independencia de las condiciones de cultivo de las plantas. La línea así obtenida, denominada IAS-245, contiene menos del 2% en peso de ácido erúcico y entre el 80% y 90% en peso de ácido oleico. La composición media en ácidos grasos de IAS-245, comparada con las líneas a partir de las que se obtuvo, se muestra en la Tabla 5.

Se ha realizado un depósito de semillas de la línea IAS-245 en el NCIMB (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria), con número NCIMB 41157 y fecha de depósito 13 de febrero de 2003.

ES 2 292 265 A1

TABLA 5

Ácidos grasos en %

Variedad	Palmítico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Eicosenoico	Erúcico
IAS-3	3.6	1.6	74.4	10.6	7.7	1.5	0.2
IAS-21	4.6	1.2	38.4	48.5	5.7	1.0	0.2
IAS-245	3.7	1.4	83.9	4.2	5.0	1.5	0.2

REIVINDICACIONES

1. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico, que incluye un contenido en ácido erúci-
co inferior al 0.5% en peso respecto al total de ácidos grasos del aceite, un contenido en ácido linoleico comprendido
entre el 2% y el 6% en peso, un contenido en ácido linolénico comprendido entre el 2% y el 10% en peso, un contenido
en ácido palmítico comprendido entre el 2% y el 8% en peso, un contenido en ácido esteárico comprendido entre el
0.5% y el 3% en peso, y un contenido en ácido eicosenoico inferior al 4%, **caracterizado** porque el contenido en ácido
oleico del aceite está comprendido entre el 80% y el 90% en peso, referido también al total de ácidos grasos del aceite.
2. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según la reivindicación 1, **caracterizado**
porque el ratio de ácido oleico a ácido linoleico es siempre superior a 15.
3. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1 y 2, **carac-
terizado** porque el contenido en ácido oleico es superior al 85%.
4. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1 a 3, **carac-
terizado** porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.1% en peso respecto al total de ácidos grasos
del aceite.
5. Aceite de semilla de mostaza etíope con alto contenido en ácido oleico según la reivindicación 4, **caracterizado**
porque el contenido en ácido erúcido del aceite es inferior al 0.05% en peso respecto al total de ácidos grasos del
aceite.
6. Semillas de mostaza etíope que poseen un aceite con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones
1-5.
7. Plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) que al ser autofecundadas producen semillas que poseen
un aceite con alto contenido en ácido oleico según las reivindicaciones 1-5.
8. Procedimiento de obtención de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun), según la reivindicación
7, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
 - a) Tratamiento de semillas normales de mostaza etíope, previamente embebidas en agua durante 16 horas,
con una solución del agente mutagénico metil-sulfonato de etilo (EMS), preparada a una concentración
comprendida entre el 0.1% y el 2% (vol/vol), durante un periodo de tiempo comprendido entre 0.5 y 6
horas.
 - b) Cultivo de las semillas tratadas según el apartado a), selección de aquellas que presentan un incremento en
el contenido en ácido oleico del aceite en comparación con las semillas de plantas normales, manteniendo
un contenido en ácido erúcido similar al de aquellas.
 - c) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido
erúcido del aceite con plantas de una línea colza (*B. napus* L.) con menos del 2% en peso de ácido erúcido en
el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y selección de plantas de mostaza
etíope con menos del 2% en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas.
 - d) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope (*Brassica carinata* A. Braun) con contenido normal en ácido
erúcido del aceite con plantas de una línea de mostaza india (*B. juncea* [L.] Czern.) con menos del 2%
en peso de ácido erúcido en el aceite de sus semillas, seguido de retrocruzamiento, autofecundación, y
selección de plantas de mostaza etíope con menos del 2% en peso de ácido erúcido en el aceite de sus
semillas.
 - e) Cruzamiento de plantas de mostaza etíope obtenidas según el apartado c) con plantas de mostaza etíope
obtenidas según el apartado d), seguido de autofecundación y selección de plantas de mostaza etíope
procedentes del mencionado cruzamiento con menos del 2% en peso de ácido erúcido en el aceite de sus
semillas.
 - f) Recombinación genética entre plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de mutagénesis química
[etapas a) y b)] y plantas de mostaza etíope obtenidas en el programa de cruzamientos interespecíficos
[etapas c), d) y e)], seguida de autofecundación y selección de semillas con bajo contenido en ácido erúcido
y alto contenido en ácido oleico.
 - g) Siembra de las semillas seleccionadas en la etapa f), seguida de autofecundación y selección para obtener
una línea estable de mostaza etíope con bajo contenido en ácido erúcido y alto contenido en ácido oleico.
 - h) Recombinación genética entre plantas de mostaza etíope obtenidas en las etapas a) a g) y plantas de mostaza
etíope caracterizadas por contenido estándar en ácido oleico y bajo contenido en ácido linolénico, seguida

ES 2 292 265 A1

de autofecundación y selección de semillas F_2 que presentan mayor contenido en ácido oleico y menor contenido en ácido linoleico y ácido linolénico que las procedentes de las plantas desarrolladas en las etapas a) a g).

5 9. Utilización de un aceite de semilla de mostaza etíope según las reivindicaciones 1 a 5, en composiciones para la alimentación humana y animal.

10 10. Utilización de un aceite de semilla de mostaza etíope según las reivindicaciones 1 a 5, en composiciones biolubricantes y biocombustibles.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 292 265

⑫ Nº de solicitud: 200300733

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 28.03.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 5625130 A (GRANT IAN & CHARNE G.DAVID) 29.04.1997	1-10
Y	VELASCO L. et al. "Isolation of induced mutants in Ethiopian mustard (Brassica carinata Braun) with low levels of erucic acid". Plant Breeding 1995. Vol. 114, Nº. 5, páginas 454-456; ISSN 0179-9541.	1-10
A	VELASCO L. et al. "Induced variability for C18 unsaturated fatty acids in Ethiopian mustard". Canadian Journal of Plant Science. 1997. Vol. 77, Nº. 1, páginas 91-95; ISSN 0008-4220.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

05.02.2008

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23D 9/00 (2006.01)

C11B 1/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)